动 物 学 研 究 2002, Apr. 23 (2): 97 ~ 105 CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853
Zoological Research

锦鲤4个人工雌核发育家系的微卫星标记研究

刘静霞[1], 周 莉[2], 赵振山[1], 桂建芳[2,3]

(1. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430072;
2. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 利用 Crooijmans *et al*. (1997) 分离的包含 CA 重复单元的普通鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.) 的 8 个微卫星 DNA 标记, 对从锦鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 的红白、大正和昭和 3 个不同品系中所获得的 4 个不同人工雌核发育家系的 20 尾个体进行 PCR 扩增。电泳结果表明, 8 对引物在 20 尾个体中均能重复稳定地扩增出相应的同源序列。随引物不同, 各等位基因数为 1 ~ 11 个, 大小在 68 ~ 264 bp。在 MFW4、MFW7、MFW19、MFW20、MFW23 和 MFW24 6 个微卫星的扩增结果中, 20 尾个体的扩增图谱呈现了高度的遗传多态性, 不同雌核发育家系内个体的遗传异质性也较大。其中大正 (TaS) 和红白 1 (RW_1) 的个体不仅花色分化显著, 而且个体间的平均遗传距离分别高达 0.28。通过对微卫星等位基因和基因型分析发现, 由于锦鲤品系中的每一个体是通过不断地杂交选育而获得, 基因组来源复杂, 基因高度杂合。因此, 只进行 1 代的人工雌核发育, 其家系内仅部分个体的部分座位出现纯合。所获得的人工雌核发育锦鲤为后续的色素遗传调控机制研究提供了必要的实验材料; 同时, 所鉴定的微卫星分子标记为进行锦鲤的分子标记育种和基因组作图提供了理想的工具。

关键词: 锦鲤; 人工雌核发育; 多态性; 微卫星标记

中图分类号: Q953; Q959.468; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254 - 5853(2002)02 - 0097 - 09

Studies on Microsatellite Markers of Four Artificially Gynogenetic Families in Ornamental Carp

LIU Jing-xia[1], ZHOU Li[2], ZHAO Zhen-shan[1], GUI Jian-fang[2,3]

(1. *The Freshwater College of Huazhong Agricultural University*, *Wuhan* 430072, *China*; 2. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology*, *Institute of Hydrobiology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: Using 8 microsatellite markers of the poly (CA) type isolated from common carp by Crooijmans *et al*. (1997), we analyzed four artificially gynogenetic families of ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.). In the four gynogenetic families, two originated from Kohaku strain, other two from Taisho and Showa respectively. Five individuals were randomly sampled from each artificially gynogenetic family. Electrophoretic patterns showed that the 8 pairs of microsatellite primers all reproducibly produced the well-identifiable and homologous DNA fragments. The number of alleles per marker varied from 1 to 11, and the size of alleles ranged from 68 bp to 264 bp. Abundant polymorphic DNA fragments among 20 individuals were observed in electrophoretic patterns produced by primers MFW4, MFW7, MFW19, MFW20, MFW23 and MFW24. The genetic polymorphism were observed between gynogenetic families and within intra-family individuals. The phenotypes of individuals of TaS and RW_1 differed from each other, and the average distances among TaS or RW_1 were 0.28. The analysis of alleles and genotypes revealed higher genetic diversity among individuals of the gynogenetic families. It suggested that each color strain of ornamental carp was selected through consistent hybridization between strains and the genomes of them are highly hybrid, so it can't produce pure lines only through one generation gynogenesis. The four artificially gynogenetic families produced in this study will offer necessary samples for further studying on genetic mechanism of body color types in ornamental carp, and the microsatellite markers will provide useful tools for marker-assisted selection breeding or gene map of ornamental carp.

Key words: Ornamental carp; Artificial gynogenesis; Polymorphism; Microsatellite marker

---

收稿日期: 2001 - 12 - 14; 接受日期: 2002 - 02 - 01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870430, 39823003); 中国科学院知识创新工程 (KSCX2 - 1 - 05); 欧盟资助项目 (Contract No.ICA4 - CT - 2001 - 10024); 武汉市科技攻关项目

3. 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

锦鲤(*Cyprinus carpio* L.)是一种极具观赏价值的鱼类,素有"活明珠"和"水中之花"的美称.在中国已有1千多年的养殖历史。近百年来,日本人对锦鲤的观赏兴趣日渐浓厚,通过杂交选育出了各种不同的观赏品系,如红白、大正、昭和、别甲等,并将其传向世界各地(Gui,1986)。红白锦鲤是1917年由兰木的五助以全身有红点斑纹的雄性"樱斑"鱼与头顶有红色斑纹的雌鱼配育而成的,其体表底色银白如雪,上镶嵌有变幻多端的红色斑纹;大正三色锦鲤于1915年由星野荣三郎培育而成,其主要特点是鱼体雪白的底色上,又浮现绯红、乌黑两色斑纹;昭和锦鲤是日本昭和二年,即1927年,由星野重吉用黄写锦鲤与红白锦鲤杂交培育而成,鱼体以黑色为底,上现红白花纹为特点;别甲则是在鱼体雪白底色上,镶嵌有漆黑如墨的黑斑(Kuroki,1990)。

由于不同花色的锦鲤是由杂交选育而来的,其性状极不稳定。且在养殖和观赏过程中又主要是以色斑这一表型特征进行挑选,加之养殖条件的限制,致使养殖者很难预测杂交子代的花色,只有通过无数次繁育,方能从千万条中获得几条具观赏价值的锦鲤(Kataoka,1989)。因此,通过人工雌核发育或者从分子水平上揭示其色素遗传机制,构建一系列具有观赏价值的锦鲤纯系,使育种者能有效地预测和控制花色,是目前锦鲤育种中亟待解决的难题。

人工雌核发育是一种有效的产生纯系的手段,而且在鱼类染色体操作、遗传分析以及性别控制等方面具有潜在的应用价值。目前,这种技术已被广泛应用于各种养殖鱼类。迄今为止,研究人员已对20多种鱼类成功地进行了人工雌核发育的研究(Streisinger *et al*.,1981;吴清江等,1981;Bongers *et al*.,1997)。Taniguchi *et al*.(1986)和Gomelsky *et al*.(1996,1998)结合人工雌核发育技术对锦鲤的色斑遗传规律进行了初步研究,但局限于用统计色斑分布概率来推测锦鲤体表色素的遗传规律。近年来,已有人将多种分子标记用于分析锦鲤与其他鲤科鱼类的亲缘关系(Anjum & Jankun,1997;Arkhipchuk,1998;Dong & Zhou,1998;Aliah,1999;Divas *et al*.,1999)。然而迄今为止,还未见利用分子标记技术结合人工雌核发育来分析锦鲤遗传多样性的报道。

微卫星DNA(microsatellite DNA)又称单一的序列重复(simple sequence repeat,SSR),由1~6个碱基对的核心序列串联重复形成,其位点数目巨大并随机分布于整个基因组中。近年来,鱼类微卫星DNA的分离进展很快,已分离了大量的包括多种海水和淡水鱼的微卫星DNA探针,并广泛应用于鱼类种群遗传分析(Christian *et al*.,1991;Arnaud *et al*.,1993;McConnell *et al*.,1995;Wright & Bentzen,1995;Grandillo & Tanksley,1996;Sanchez *et al*.,1996;Moira & Roy,1998;Shaw *et al*.,1999;Xu,1999)、亲本鉴定(Vankan & Faddy,1999)、基因组作图(Lie *et al*.,1994;Ela *et al*.,1998;Nobuyoshi *et al*.,1999)、系统发育(Zardoya *et al*.,1996)和育种计划等多个研究领域。微卫星DNA标记具有极高的个体特异性、可重复性、并能提供丰富的多态位点及基因座位纯合度的信息。与其他分子标记相比,具有明显的优势(O'Connell & Wright,1997)。由于微卫星座位两侧的引物在亲缘关系相近物种之间具有很高的保守性(Brooker *et al*.,1994),因而在本研究中,我们首先通过人工雌核发育获得了4个锦鲤的人工雌核发育家系,并从Crooijmans *et al*.(1997)分离的包含CA重复单元的普通鲤鱼的41个微卫星DNA标记中选取了8对引物,对锦鲤不同人工雌核发育家系进行比较分析。以此用于评价人工雌核发育的效果,并通过检测4个不同人工雌核发育家系间及家系内的多态性,探讨锦鲤色斑遗传多样性的机制。

1 材料与方法

1.1 人工雌核发育锦鲤的获得

锦鲤的人工雌核发育实验于2000年在武汉新世界水族馆进行。所有人工雌核发育锦鲤的获得均参照传统的人工雌核发育的方法进行(Mair *et al*.,1987;桂建芳等,1990,1991;贾海波等,2002)。获得的4个人工雌核发育家系的编号分别为红白1(RW_1)、红白2(RW_2)、大正(TaS)和昭和(ShS)。分别从RW_1、RW_2、TaS和ShS 4个雌核发育家系中各随机抽取5尾个体进行微卫星标记研究,各尾鱼的编号及花色见表1。

1.2 基因组DNA的提取

基因组DNA的提取参照标准酚-氯仿抽提程序(Sambrook *et al*.,1989)进行,并通过琼脂糖电泳定量DNA(周莉等,1998;Zhou *et al*.,2000)。

1.3 PCR反应

本研究所采用的8对微卫星引物分别为MFW1、MFW4、MFW7、MFW19、MFW20、MFW23、MFW24和MFW28,各对引物的序列见表2。PCR扩增反应总体积为25 μL,内含约50 ng的模板DNA,0.2 μmol/L引物,0.5 U Taq酶(Biostar International),0.1 μmol/L的dNTP和1×Taq反应缓冲液(Crooijmans *et al*.,1997;周莉等,2001)。PCR反应扩增程序参照Crooijmans *et al*.(1997)进行。整个反应为35个循环。每个循环包括94℃变性30 s,退火45 s,72℃延伸60 s。各对引物的特异退火温度见表2。首次循环前先预变性4 min,最后1次循环结束后72℃延伸7 min。

1.4 扩增产物的电泳分析

在5 V/cm的低电压低温下采用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完毕后用溴化乙锭染色,在White/Ultraviolet Transilluminator(UVP, Ultra-Violet Products)上观察、记录和分析。

1.5 人工雌核发育系间平均遗传距离分析

在所扩增的8对引物获得可重复的清晰的DNA带纹后，用1或0分别表示DNA带的有或无，根据Nei & Li (1979) 的分析公式进行数据分析，采用UPGMA聚类法构建分支图。

2 结果与分析

2.1 等位基因及其基因型分析

表1 锦鲤4个人工雌核发育家系20尾个体的花色类型

Table 1 The color type of 20 individuals from four artificial gynogenetic families of ornamental carps

编号 Number	花色 Body color	编号 Number	花色 Body color
RW_{1-1}	体白，头有红斑	TaS_{-1}	以白色为底、镶嵌红、黑两色斑纹
RW_{1-2}	通体全红	TaS_{-2}	以黑色为底，镶嵌白色斑纹
RW_{1-3}	鱼体以黑色为底，上呈现红、白两色斑	TaS_{-3}	以白色为底，镶嵌红色斑纹
RW_{1-4}	以白色为底，镶嵌红色斑纹	TaS_{-4}	体白，头有红斑
RW_{1-5}	体白、头红	TaS_{-5}	以白色为底，镶嵌红色斑纹
RW_{2-1}	以白色为底，镶嵌红色斑纹	ShS_{-1}	以黑色为底、上呈现红、白两色斑
RW_{2-2}	以白色为底，镶嵌红色斑纹	ShS_{-2}	以白色为底，镶嵌红色斑纹
RW_{2-3}	以白色为底，镶嵌红色斑纹	ShS_{-3}	以白色为底、镶嵌红色斑纹
RW_{2-4}	体白、头红	ShS_{-4}	体白，头有红斑
RW_{2-5}	以黑色为底，上呈现红、白两色斑	ShS_{-5}	以白色为底，镶嵌红色斑纹

表2 8对微卫星DNA引物的序列、特异退火温度及20尾锦鲤个体中PCR扩增的等位基因的数目和大小

Table 2 Sequence of eight microsatellite marker primers used in this study, specific annealing temperature of PCR amplification, and number and size of alleles detected in 20 individuals of ornamental carps

微卫星标记 Microsatellite marker	引物序列 Primer sequence	重复序列 Repetitive sequence	退火温度 Annealing temperature (℃)	等位基因数 Number of alleles	等位基因大小 Size of alleles (bp)
MFW1	5'-GTCCAGACTGTCATCAGGAG-3'	CA	59	2	200, 170
	5'-GAGGTGTACACTGAGTCACGC-3'				
MFW4	5'-CACACCGGGCTACTGCAGAG-3'	CA	64.5	5	218, 190, 178, 164, 144
	5'-GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC-3'				
MFW7	5'-TCCAAGTCAGTTTAATCACCG-3'	CA	64	5	258、250、240、218、206
	5'-CGGAAGCGTTGACAACAAGC-3'				
MFW19	5'-GAATCCTCCATCATGCAAAC-3'	CA	64.5	2	160, 148
	5'-GCACAAACTCCACATTGTGCC-3'				
MFW20	5'-CAGTGAGACGATTACCTTGG-3'	CA	59	3	264, 242, 202
	5'-GTGAGCAGCCCACATTGAAG-3'				
MFW23	5'-GTATAATTCGGAGTTTTACGC-3'	CA	60	11	192, 184, 176, 174, 170, 156, 152, 146, 136, 130, 112
	5'-CAGGTTTATCTCCCTTCTAG-3'				
MFW24	5'-GCTCCAGATTGCACATTATAG-3'	CA	64.5	6	244、240、234、214、210、202
	5'-CTACACACACGCACAGCCTTTC-3'				
MFW28	5'-GATCCCTTTTGAATTTTTCTAG-3'	CA	54	1	68
	5'-ACAGTGAGGTCCAGAAGTCG-3'				

本研究采用 10%非变性聚丙烯酰胺凝胶，低电压低温电泳分离 PCR 产物，效果较好。所采用的 8 对微卫星引物均能在锦鲤中稳定重复地扩增出相应的同源序列，大小在 100～300 bp（表 2）。其中 MFW1（图 1，MFW1）和 MFW28 的扩增图谱在 20 尾个体之间无差异；而 MFW4、MFW7、MFW19、MFW20、MFW23 和 MFW24 6 个微卫星 DNA 标记不仅反映了人工雌核发育家系间的遗传异质性，也呈现出人工雌核发育家系内的个体多态性。

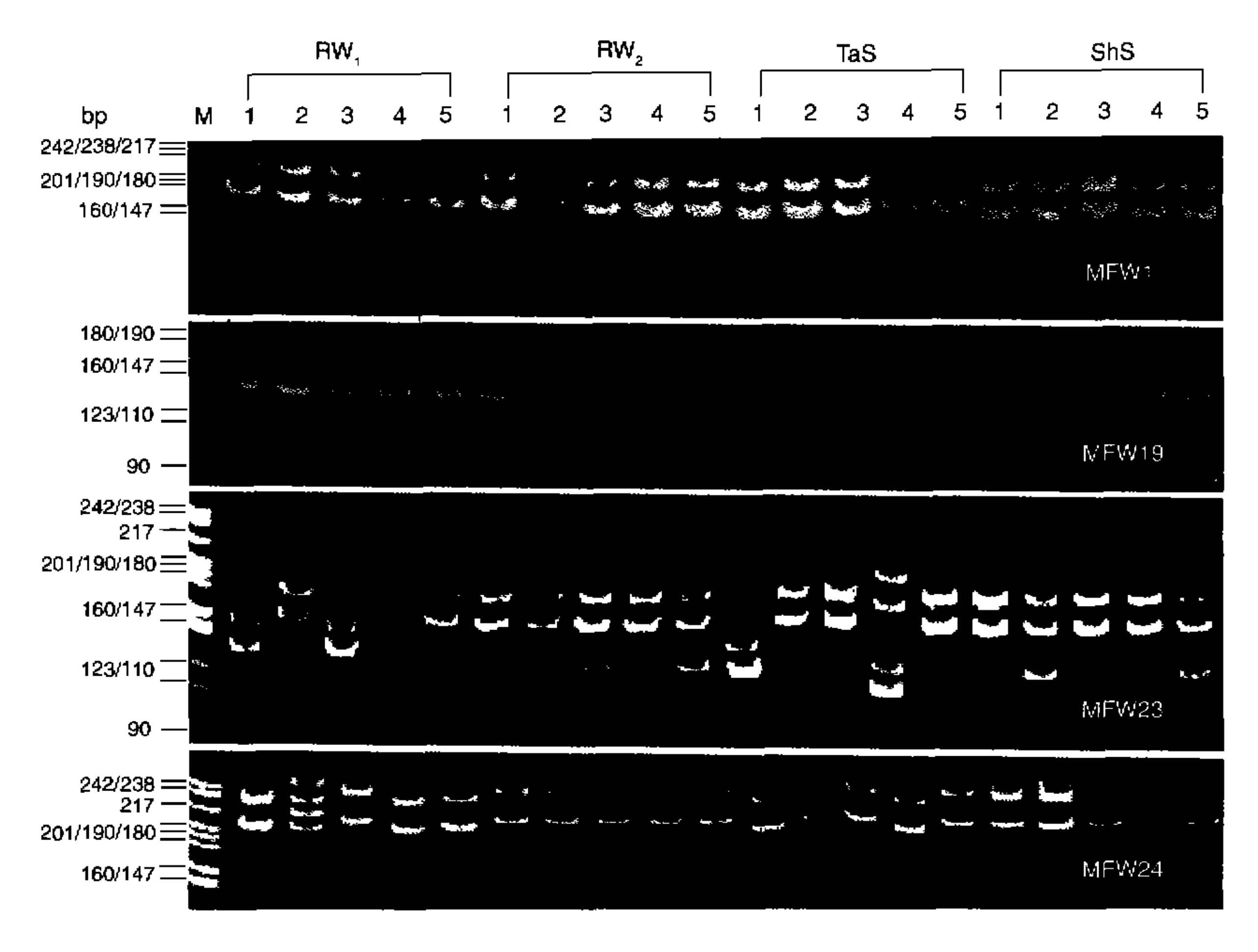


图 1 MFW1、MFW19、MFW23 和 MFW24 扩增的 4 个人工雌核发育锦鲤家系 20 尾个体的典型微卫星标记电泳图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of 4 typical microsatellite markers amplified by MFW1、MFW19、MFW23 and MFW24 from 20 individuals in 4 artificial gynogenetic families of ornamental carps

在所分析的 8 个微卫星标记中，MFW1 和 MFW28 在 4 个人工雌核发育家系的 20 尾个体中探测到的等位基因数分别为 2 和 1，大小分别为 200、170 和 68 bp。根据微卫星标记的命名规则和它所扩增的等位基因的大小，分别命名为 1－200、1－170 和 28－68。其余的 6 个微卫星标记在 20 尾个体中所检测到的等位基因数较多，MFW19 共检测到 2 个等位基因（图 1：MFW19）；MFW4、MFW7 检测到的等位基因数均为 5 个；MFW20 所检测到的等位基因数均为 3 个；MFW23 所检测到的等位基因数为 11（图 1：MFW23）；MFW24 所检测到的等位基因数为 6（图 1：MFW24；表 2、3）。1 对微卫星引物从杂合的二倍体的 DNA 中仅能扩增出 2 条带，但 MFW19、MFW23 和 MFW24 等引物在一些个体中却同时扩增出了 2～5 条 DNA 带（图 1）。其原因可能是这些片段在基因组中是多拷贝的，因为锦鲤的染色体数为 100，为二倍化的四倍体（Wolf *et al*.，1969）。我们推测在锦鲤的 1 个个体中同时呈现了多个等位基因的现象，与锦鲤的多倍性有关，也与养殖锦鲤来自于品系间的不断杂交导致其基因组高度杂合有关。

一般而言，1 个微卫星座位的特异引物在纯合的材料中只能扩增 1 条 DNA 带（Crooijmans *et al*.，1997）。因此，根据微卫星扩增图谱，可以认为只进行 1 代的人工雌核发育，在子代个体中只能产生部分个体、部分座位的纯合。

在 8 对微卫星引物的扩增图谱中，除引物 MFW1 和 MFW28 在 20 尾个体中均扩增出相同的带型外，其余 6 对引物都扩增出丰富的多态片段。其中 RW_1 和 TaS 人工雌核发育家系内的个体多态性高于 RW_2 和 ShS 雌核发育家系。就基因型而言，在 MFW19 的扩增图谱中，20 尾个体可检测到 2 种基因型，RW_1 和 ShS 家系内只呈现 1 种基因型，RW_2 和 TaS 家系内呈现 2 种基因型；在 MFW24 的扩增图谱中，20 尾个体呈现了 3 种基因型，其中 RW_1 的 5 尾个体就扩增出 3 种基因型，而 RW_2、TaS、ShS 3 个家系内个体呈现的基因型分别为 1、2、1；而在 MFW23 的扩增图谱中，20 尾个体共呈现了 8 种基因型，其中，RW_{1-1}、RW_{1-3}、RW_{1-4}、RW_{1-5}、TaS_{-1}和 Tas_{-4} 6 尾个体都各自扩增出其独特的基因型；RW_{2-3}、RW_{2-5}、ShS_{-2}和 ShS_{-5} 4 尾个体具有相同的基因型，由大小分别为 176、156、136 和 130 bp 的 4 个等位基因组成；而 RW_{1-2}和 RW_{2-1}等其余 7 尾的基因型相同，都由 MFW23 - 176 和 MFW23 - 156 2 个等位基因组成，即雌核发育家系 RW_1、RW_2、TaS、ShS 内的个体分别呈现了 5、2、3、2 种基因型（表 3 和图 1）。与雌核发育锦鲤家系内个体的色斑多样性分化相一致的是，来自同一母本的雌核发育家系内的个体，微卫星标记均存在多态性。这是因为锦鲤品系内的每一个体都是由不同锦鲤品系间杂交选育后获得的。即不同的锦鲤品系进行杂交，再将子代依其色斑以及分布又分归为不同的品系，如此杂交选育再杂交，导致锦鲤个体基因组来源复杂、高度杂合，因此，不仅微卫星等位基因呈现多样性遗传，而且控制色斑形成的基因也呈现多样性遗传，此外，微卫星标记也出现多样性遗传。

表 3　锦鲤 4 个人工雌核发育系的 20 尾个体的基因型

Table 3　Genotypes of 20 individuals from four different artificial gynogenetic families of ornamental carp

微卫星标记 Microsatellite marker	基因型及其等位基因 Genotype and alleles	特异于该基因型的个体数 No. of individuals specific for the genotype
MFW1	1-200, 1-170	20
MFW4	4-218, 4-190, 4-178, 4-164, 4-144	9
	4-178, 4-164, 4-144	11
MFW7	7-258, 7-250, 7-240, 7-218, 7-206	1
	7-258, 7-240, 7-206	2
	7-258, 7-250, 7-218	3
	7-250, 7-218	14
MFW19	19-160, 19-148	4
	19-148	16
MFW20	20-264, 20-242	19
	20-200	1
MFW23	23-176, 23-156, 23-136, 23-130	4
	23-192, 23-170, 23-130, 23-112	1
	23-184, 23-152, 23-136	1
	23-174, 23-152, 23-136	1
	23-176, 23-156, 23-130	1
	23-146, 23-136	1
	23-136, 23-130	1
	23-176, 23-156	10
MFW24	24-244, 24-234, 24-214, 24-202	1
	24-240, 24-210	13
	24-234, 24-202	6
MFW28	28-68	20

2.2　锦鲤人工雌核发育家系内和家系间的平均遗传距离分析

根据 Nei & Li（1979）的分析公式，计算了 20 尾个体间的遗传距离，并使用 NJTREE 软件，采取 UPGMA 方法构建它们相互关系的分支图。与人工雌核发育家系内个体花色分化程度一致，RW_1 的 5 尾个体花色分化显著，其个体间的平均遗传距离也最大，约为 0.28；其次为花色分化同样显著的 TaS 的 5

尾,个体间的平均遗传距离约为0.275;ShS的5尾个体间的平均遗传距离最小,约为0.034(表4)。人工雌核发育家系内平均遗传距离分析的结果表明:①只进行1代人工雌核发育,并不能获得性状完全一致的子代个体;②与家系内个体表型显著分化相一致,微卫星等位基因也存在高度的遗传多样性。

表4 锦鲤4个人工雌核发育系内或系间的平均遗传距离

Table 4 Average genetic distances among the four intra- and inter-families of artificial gynogenetic ornamental carp

	RW_1	RW_2	TaS	ShS
RW_1	0.28±0.0599			
RW_2	0.28±0.0997	0.0648±0.0586		
TaS	0.293±0.110	0.202±0.187	0.275±0.203	
ShS	0.290±0.113	0.079±0.0555	0.206±0.180	0.0343±0.0295

锦鲤品系是通过多代杂交选育而来,遗传性状极不稳定;且其色素分布是由多个基因控制的。因此尽管经过了1代雌核发育,其子代的色斑分化依然比较显著。与此一致的是,在根据遗传距离构建的分支图上,20尾个体依据表型的差异或母本不同,相互交织在一起,但也反映了部分个体体色之间的关系(图2)。譬如,TaS_{-3}和TaS_{-5}尽管母本为大正,但表型为红白,它们与RW_{2-1}、RW_{2-2}和RW_{2-3}首先聚成一类;TaS_{-2}和ShS_{-1}表型都为昭和,尽管它们分属不同的雌核发育家系,但它们不仅花色组成相近,而且TaS_{-2}和ShS_{-1}间的遗传距离为0,与母本为昭和的ShS_{-4}的遗传距离也为0。同时表型为昭和的个体RW_{2-5}和母本为昭和的ShS_{-2}、ShS_{-5}聚成另一类。实验结果表明,由于锦鲤品系的鉴别是建立在其表型的基础上,且锦鲤的种间杂交及其选育再杂交过程导致锦鲤的基因组来源复杂,基因杂合度高,因而由不同锦鲤品系所得到的雌核发育个体可能具有相同的染色体组来源。因此,各人工雌核发育家系内个体的聚类并不单独由其母本决定,而与从母本处所获得的染色体组相关。

3 讨 论

日本人已培育了13种基本花色的锦鲤品系,利用13种彼此杂交又产生了各种各样色彩斑斓的锦鲤(Kuroki,1990)。但困绕锦鲤养殖者的难题仍然是其选育。Kotaoka(1989)曾指出,经验丰富的育种者即使很仔细地进行锦鲤品系间的交配,仍很难预测其子代的色斑分化。因此育种者必须经过数10次挑选,从数以千计的仔鱼中保留最有观赏潜力的加以养殖,并且其中可能只有0.1‰~1‰的个体可以作为以后生产繁育的亲本(Balon,1995)。这也是目前锦鲤价格随其观赏价值的增长而成指数比例增长的原因。所以,锦鲤育种急需解决的问题是揭示锦鲤色斑遗传的调控机制,人为地控制锦鲤的色斑遗传。而纯合的品系有利于构建基因图谱,可提高分析质量性状遗传的成功率(Young *et al.*,1996)。因此培育锦鲤的纯合品系,既可选育一些具有优良性

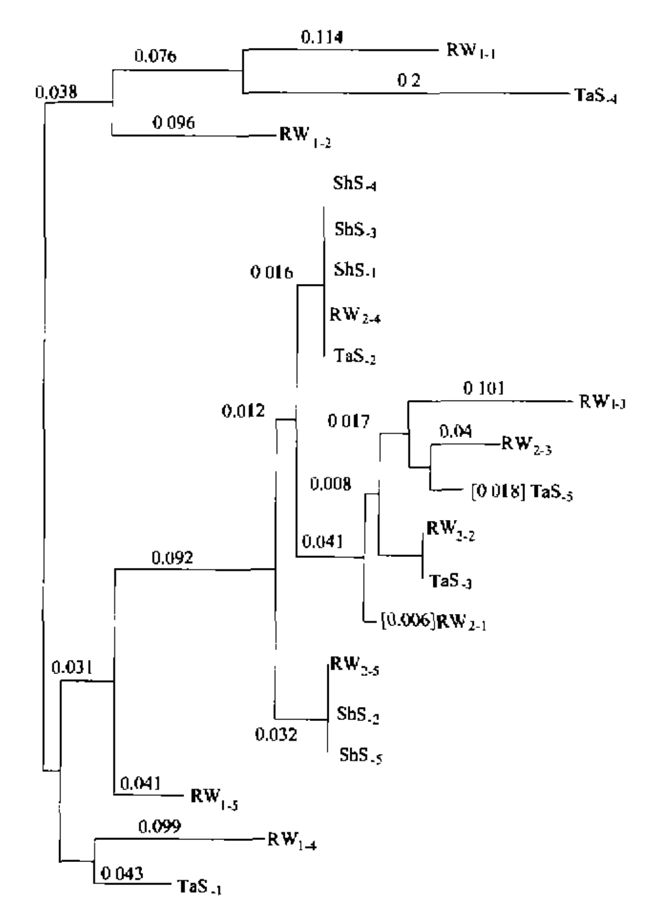


图2 根据锦鲤4个人工雌核发育系的20尾个体的扩增结果,采用UPGMA聚类法构建的分支图。

Fig.2 Dendrogram of the 20 individuals in 4 artificial gynogenetic families of ornamental carp obtained by UPGMA cluster analysis.

状的锦鲤用于以后的生产繁殖，又可获得研究锦鲤色斑遗传调控机制的实验材料。吴清江等(1981)和 Streisinger *et al*. (1981)几乎同时研制出了一套完整的以连续两代人工雌核发育结合性别人工控制建立纯系的技术方案。但是，在人工雌核发育中还有很多问题需要解决，对其操作过程和机理的探讨再结合锦鲤的色斑分化研究，将有助于我们进行更有效的操作以构建具有较高品位的锦鲤人工雌核发育纯系。

人工雌核发育是一种有效产生纯系的快速方法，1 次有丝分裂雌核发育相当于 8～10 个世代同胞兄妹交配，1 次有丝分裂加 1 次极体雌核发育就可以获得纯系(吴清江等，1981；Streinger，1981)。研究人员曾运用同工酶和转铁蛋白等分子标记技术，证实了经过 1 代人工雌核发育后，家系内个体的遗传同质性明显提高(杨书婷和桂建芳，1999)。贾海波等(2002)运用 RAPD 技术分析了 2 个不同的红白人工雌核发育家系，结果也表明同一雌核发育家系内的个体具有较高的遗传同质性，不同雌核发育家系间的个体具有高度的遗传异质性。而同工酶检测提供的信息量少。RAPD 技术扩增出来的 DNA 片段的遗传背景不清楚，重复性差。虽能较好地反映群体间的区别，但它提供的多态位点信息量少。只有微卫星 DNA 标记具有极高个体特异性、可重复性好、能提供丰富多态位点信息，并且可以简单快捷地辨别杂合的减数分裂型雌核发育个体(Ferguson *et al*.，1995)。因此在本研究中我们运用微卫星 DNA 标记技术，检测 4 个人工雌核发育家系的遗传同质性和纯合度，获得了较为满意的结果。

微卫星的扩增图谱显示，在 8 对微卫星座位中，除引物 MFW28 稳定地扩增出 1 条 DNA 带、其余 7 对引物能扩增出多至 2 条，个别个体甚至扩增出 5 条 DNA 片段。但 Crooijmans *et al*.(1997)认为 1 个微卫星座位的特异引物在纯合的材料中只能扩增 1 条 DNA 带。因此可以确定人工雌核发育锦鲤 F_1 代只在个别微卫星座位出现纯合、大部分个体在大多数座位都属于杂合的，这可能由于进行极体雌核发育时，同源染色体之间出现了染色体片段的交换重组。Chourrout(1988)曾指出，在阻止第 2 极体排出而获得的雌核发育鱼中，一定存在某种程度的杂合个体。因此，只进行 1 次人工雌核发育，很难获得纯合度高的雌核发育子代。在本研究中：①个别个体某个座位存在多个等位基因；②1 个人工雌核发育家系内的 5 尾个体在 1 个座位甚至存在 5 种基因型；③部分引物在所有个体中均扩增出 2 种大小范围不同的微卫星产物；都可能与锦鲤的多倍性以及锦鲤的高度杂合性有关。

Larhammar & Risinger(1994)的研究结果表明，一些基因如生长激素基因和促性腺激素基因在鲤鱼基因组中存在多个座位，结合未观察到鲤鱼的有丝分裂过程中产生四价体和丢失染色体的现象(Ohno *et al*.，1967)，他们推测鲤鱼的染色体来源于 2 套不同的染色体。与此结论一致的是，Crooijmans *et al*.(1997)将他们所分离的微卫星引物用于检测不同的鲤鱼品系，观察到一些引物如 MFW23 在检测种间杂交产生的品系和部分种内杂交产生的品系的个体时，可同时扩增出 2 种大小范围不同的微卫星产物，并且在个体间存在多态性。而同样的引物在纯合的雌核发育鱼中只扩增到 1 条 DNA 产物。由此，他们推测鲤鱼属于复合四倍体(即种间杂交产生)，而不是自发加倍的四倍体。在本实验中，MFW23 等引物也扩增出 2 种大小范围不同的 DNA 片段(图 1，表 2)。但是，对一个四倍体而言，一个微卫星座位最多只能扩增出 4 条 DNA 片段。在本实验中，相同的扩增条件在个别个体中却扩增出同样强度的 5 条 DNA 片段，这些 DNA 片段是否同属于一个微卫星座位，还需进一步克隆、测序和鉴定。

在所分析的 4 个人工雌核发育锦鲤家系中，部分雌核发育家系如 TaS 和 RW_1 系内个体具有较高的遗传异质性(表 4)。与运用 RAPD 分析所获得的结果(贾海波等，2002)相比较，异质性显著增大。除了两种方法不同外，本实验所扩增的微卫星引物较少，参与统计的片段数较少，也是导致结果如此悬殊的主要原因。而 RW_2 和 ShS 家系内的平均遗传距离明显低于 TaS 和 RW_1 家系内的平均遗传距离，这可能是由于 RW_1 和 TaS 的母本是由不同品系杂交而来，杂合度大，从而子代遗传性状分化显著所致；而 RW_2 和 ShS 的母本可能是由同一品系经多代自交而来，纯合度相对较高，经一代人工雌核发育后，其系内个体的遗传同质性也显著提高。

在根据遗传距离构建的分支图上，20 尾个体依据表型的差异或母本的不同，相互交织在一起，但也反映了部分个体体色之间的关系(图 2)。本研究一方面从分子水平上证实了不同锦鲤品系的种间杂交起源，另一方面，从分子水平上揭示了色斑分化难以预测的原因。因此，我们需要通过人工雌核发育的

方法获得锦鲤纯系，以达到预测色斑分化的目的。但在本研究中，我们并未鉴定到与锦鲤表型相关的分子标记。关于微卫星等位基因是否与其表型存在相关性，还需进行大样本检测，并结合统计学的数据分析才能得到确凿的结论。不过，利用本实验所获得的微卫星标记，结合人工雌核发育锦鲤的表型进行选择育种，不仅可以大大提高人工雌核发育 F_2 代的遗传同质性和基因座位的纯合率，而且利用微卫星标记均相同的同胞(父本通过转性获得)杂交，同样可以获得遗传同质性大大提高的子代个体。本研究获得的人工雌核发育锦鲤纯系的建立，为后续的色斑遗传调控机制的研究提供了必要的实验材料；同时，所鉴定的微卫星分子标记为进行锦鲤的分子标记育种和基因组作图提供了理想的工具。

参考文献：

Aliah R S. 1999. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Fisheries Science*, **65**(2): 235 - 239.

Anjum R, Jankun M. 1997. Silver and chromomycin A3 straining of nucleolus organizer regions in the chromosomes of ornamental (koi) common carp, *Cyprinus carpio* L[J]. *Cytobios*, **90**(361): 73 - 79

Arkhipchuk V V. 1998. Peculiar changes of nucleolar quantitative characteristic in fish cells[J]. *Cytobios*, **94**(376): 81 - 96.

Arnaud E, Pablo P, Francine K, *et al*. 1993. (GT)n and (CT)n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L (brown trout)[J]. *Heredity*, **71**: 488 - 496.

Balon E K. 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers[J]. *Aquaculture*, **129**: 3 - 48.

Bongers A B J, Ben-Ayed M Z, Zandieh-Doulabi B, *et al*. 1997. Origin of variation in isogenic gynogenetic and androgenetic strains of common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Experimental Zoology*, **277**: 72 - 79.

Christian S, Bill A, Diethard T. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species[J]. *Nature*, **354**: 63 - 65.

Chourrout D. 1988. Induction of Gynogenesis, Triploidy, Tetraploidy in Fish[M]. ISI Atlas of Science. 65 - 70.

Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, *et al*. 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Animal Genetics*, **28**: 129 - 134.

Divas K M, Dixon P I, Harris J H. 1999. Allozyme and mitochondrial DNA analysis of carp, *Cyprinus carpio* L. from south-eastern Australia[J]. *Marine and Freshwater Research*, **50**(3): 253 - 260.

Dong Z, Zhou E. 1998. Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp, *Cyprinus carpio* L[J]. *Aquacuture Reseach*, **29**: 595 - 600.

Ela W K, Alec G, Marc E, *et al*. 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Nature Genetic*, **18**: 338 - 343.

Ferguson A, Taggart J B, Prodohl P A, *et al*. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*[J]. *J. Fish Biol.*, **47**(suppl.): 103 - 126.

Grandillo S, Tanksley S D. 1996. Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*[J]. *Thero. Appl. Genet.*, **92**: 957 - 965.

Gomelsky B, Cherfas N B, Bendorn N, *et al*. 1996. Color inheritance in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* L.) inferred from color variability in normal and gynogenetic progenies[J]. *Isreali of Journal of Aquacuture*, **48**: 219 - 230.

Gomelsky B, Cherfas N, Hulata G. 1998. Studies on the inheritance of black patches in ornamental (koi) carp[J]. *Isreali of Journal of Aquacuture*, **50**: 134 - 139.

Gui J F. 1986. Ornamental carp[J]. *Reservoir Fisheries*, **5**: 40 - 42.

Gui J F, Sun J M, Liang S C, *et al*. 1990. Studies on genome manipulation in fish: Ⅰ. Induction of triploid transparent colored crucian carp (*Carassius auratus* trasparent colored variety) by hydrostatic pressure [J]. *Acta Hydrobiologic Sinica*, **14**(4): 336 - 344. [桂建芳，孙建民，梁绍昌，等. 1990. 鱼类染色体组操作的研究：Ⅰ. 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫. 水生生物学报, **14**(4): 336 - 344.]

Gui J F, Sun J M, Liang S C, *et al*. 1991. Studies on genome manipulation in fish: Ⅱ. Tetrapioidy induced by hydrostatic pressure treatment and a combination of hydrostatic pressure and cold treatments in transparent colored crucian carp[J]. *Acta Hydrobiologic Sinica*, **15**(4): 333 - 341. [桂建芳，孙建民，梁绍昌，等. 1991. 鱼类染色体组操作的研究：Ⅱ. 静水压处理和静水压与冷休克结合处理诱导水晶彩鲫四倍体. 水生生物学报, **15**(4): 333 - 341.]

Jia H B, Zhou L, Gui J F. 2002. The establish of two artificial gynogenetic red-write ornamental carp and detection of RAPD markers[J]. *Acta Hydrobiologic Sinica*, **26**(1): 1 - 7. [贾海波，周 莉，桂建芳. 2002. 两个不同锦鲤的红白雌核发育系的建立及其 RAPD 分子鉴别标记. 水生生物学报, **26**(1): 1 - 7.]

Kataoka M. 1989. Nishikigoi Dangi (Short Stories) [M]. Kumagayashi: Takayoshi Kataoka.

Larhammar D, Risinger C. 1994. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **3**: 59 - 68.

Kuroki T. 1990. Manual to Nishikigoi[M]. Shimonoseki: Shuji Fujita.

Lie Φ, Slettan A, Lingaas F. 1994. Haploid gynogenesis: A powerful strategy for linkge analysis groups[J]. *Genome Res.*, **6**(4): 280 - 289

McConnell S, Hamilton L, Morris D. 1995. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Altantic salmon[J]. *Aquatulture*, **137**: 19 - 30

Moira M F, Roy G D. 1998. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collection[J]. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **55**: 1553 - 1563.

Nei M, Li W H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 213 - 219.

Nobuyoshi S, Ela W K, John Z, *et al*. 1999. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers [J]. *Genomics*, **58**: 219 - 232.

O'Connell M, Wright J M. 1997. Microsatellite DNA in fishes[J]. *Reviews in Fish Biology & Fisheries*, **7**: 331 - 363.

Ohno S, Muramoto J, Atkin N B. 1967. Diploid-tetraploid relationship among old-world members of the fish family, Cyprinidae[J]. *Chromosoma*, **23**: 1 - 19.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 463 - 468.

Sanchez J A, Clabby C, Ramos D. 1996. Protein and mocrosatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon)[J]. *Heredity*, **77**: 423 - 432.

Shaw P W, Turan C, Wright J M, *et al*. 1999. Microsatellite DNA analysis

动 物 学 研 究 2002, Apr. 23 (2): 105, 106, 112, 135 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

简报

新疆鸟类环志与回收

马 鸣[1,3], Pau J.LEADER[2], Geoff J.CAREY[2], Barry WILLIAMS[2]
(1.中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2.香港观鸟会, 香港)

摘要: 2001年8月14~26日在新疆阿勒泰、吐鲁番的8个环志地点进行了秋季鸟类环志工作。环志鸟类233只, 约33种, 多以莺亚科 (Sylviinae) 和鸫亚科 (Turdinae) 的种类为主。其中的新疆歌鸲 (*Luscinia* sp.) 等17种鸟类均属于中国首次环志种类, 占环志种数的53%。

关键词: 鸟类; 环志; 新疆
中图分类号: Q959.7 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2002)02-0105-04

A Report of Birds Banding and Recovery in Xinjiang, China

MA Ming[1], Pau J.LEADER[2], Geoff J.CAREY[2], Barry WILLIAMS[2]
(1.*Xinjiang Institute of Ecology and Geography*, *Urumqi*, *Xinjiang* 830011, *China*; 2.*Hong Kong Bird Watching Society*, *GPO Box* 12460, *China*)

Abstract: A total of 233 birds, belonging to 33 species, were caught and banded during August 14-26, 2001 at eight sites in

收稿日期: 2002-02-04; 接受日期: 2002-03-07
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970132, 39899400); 科技部国家重点基础研究发展规划项目 (G1999043509)
3.通讯作者, Tel: 0991-3840369 (H), Fax: 0991-3835459, E-mail: maming3211@yahoo.com

(上接第104页)

of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analysis[J]. *Heredity*, **83**: 490-499.

Streisinger G, Walker C, Dower N, *et al*. 1981. Production of homozygous diploid zebra fish[J]. *Nature*, **291**: 293-296.

Taniguchi N, Kijima A, Tamura T, *et al*. 1986. Color, growth and maturation in ploidy-manipulated fancy carp[J]. *Aquaculture*, **57**: 321-328.

Vankan D M, Faddy M J. 1999. Estimation of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings[J]. *Animal Genetics*, **30**: 355-361.

Wright J M, Bentzen P. 1995. Microsatellites: genetic markers for the future [A]. In: Carvalho G R, Pitcher T J. Molecular Genetics in Fisheries [M]. London: Chapman & Hall. 117-121.

Wu Q J, Ye Y Z, Chen D R, *et al*. 1981. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line[J]. *Acta Genetica Sinica*, **8**(1): 50-55. [吴清江, 叶玉珍, 陈德荣, 等. 1981. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究. 遗传学报, **8**(1): 50-55.]

Xu Z. 1999. Identification of abundant and informative microsatellite from shrimp (*Penaeus monodon*) genome[J]. *Animal Genet*., **30**: 150-156.

Yang S T, Gui J F. 1999. Isozyme analysis and preliminary confirmation of the genetic markers in two artificial gynogenetic populations of silver carp, *H. molitrix*[J]. *Acta Hydrobiologic Sinica*, **23**(3): 264-268. [杨书婷, 桂建芳. 1999. 两个雌核发育白鲢群体同工酶分析及遗传标记的确定. 水生生物学报, **23**(3): 264-268.]

Young W P, Wheeler P A, Thorgaard G H. 1996. DNA fingerprinting confirms isogenicity of androgenetically derived rainbow trout lines [J]. *J. Hered*., **87**(1): 77-80.

Zardoya R, Vollmer D M, Craddock C. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichilid fishes (Pieces: Perciformes)[J]. *Proc R Soc Lond. B*., **263**: 1589-1598.

Zhou L, Fan L C, Gui J F. 1998. RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic materials in multiple species of silver crucian carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **22**(4): 301-306. [周 莉, 樊连春, 桂建芳. 1998. 银鲫复合种外源遗传物质整入的 RAPD 分析. 水生生物学报, **22**(4): 301-306.]

Zhou L, Wang Y, Gui J F. 2000. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers [J]. *Cytogenet. Cell Genet*., **88**: 133-139.

Zhou L, Liu J X, Gui J F. 2001. Preliminary investigation on genetic diversity of gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) detected by microsatellite DNA[J]. *Zool. Res*., **22**(4): 257-264. [周 莉, 刘静霞, 桂建芳. 2001. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探. 动物学研究, **22**(4): 257-264.]